

2013 29013 A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の臨界期曝露による生殖内分泌機能の遅発影響に視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的変化が果たす役割と
閾値に関する研究

(H25－化学－一般－003)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 緑

平成 26(2014)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の臨界期曝露による生殖内分泌機能の遅発影響に視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的変化が果たす役割と
閾値に関する研究

(H25－化学－一般－003)

平成 **25** 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 緑

平成 **26(2014)**年 3 月

目次

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業） 総括研究報告書

化学物質の臨界期曝露による生殖内分泌機能の遅発影響に視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的变化が果たす役割と閾値に関する研究

..... 吉田 緑 p. 1

II. 分担研究報告

化学物質の臨界期曝露による視床下部キスペプチンの変化と遅発影響の閾値の関連性

..... 吉田 緑 p.29

遅発影響の発現機序検索。特に視床下部 LH サージ制御部位のキスペプチンの変化と生殖機能遅発影響について・

..... 高橋 美和 p.37

遅発影響の発現機序検索。特に視床下部パルス制御部位のキスペプチンの変化と卵巣がもたらす相互作用および遅発影響による卵巣の変化の閾値について。-キスペプチンパルス制御部位と遅発影響の関係—遅発影響と閾値の関連性-

..... 代田 真理子 p.55

遅発影響の発現機序検索。特に遅発影響をもたらす視床下部の制御部位の優位性に関する内分泌学の全般に関わるアプローチ

..... 渡辺 元 p.71

新生仔マウスへの Ethynylestradiol 投与が及ぼす発育期と性成熟後（遅発性）の影響

..... 横須賀 誠 p. 91

化学物質およびホルモンの臨界期曝露による神経内分泌系への遅発型影響に対する神経行動学的アプローチ

..... 川口 真以子 p103

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... p.125

IV. 研究成果の刊行物

..... p. 127

I. 総括研究報告

課題番号 H25-化学-一般-003
厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

化学物質の臨界期曝露による生殖内分泌機能の遅発影響に視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的变化が果たす役割と閾値に関する研究

研究代表者	吉田 緑	国立医薬品食品衛生研究所病理部 室長
研究分担者	高橋 美和	国立医薬品食品衛生研究所病理部 主任研究員
	代田 眞理子	麻布大学獣医学部 准教授
	渡辺 元	東京農工大学農学部 教授
	横須賀 誠	日本獣医生命科学大学獣医学部 准教授
	川口 真以子	武蔵野大学薬学部 講師
研究協力者	井上 薫	国立医薬品食品衛生研究所病理部 主任研究員
	市村 亮平	国立医薬品食品衛生研究所病理部
	森川 朋美	国立医薬品食品衛生研究所病理部
	東村 博子	名古屋大学農学部
	上野山 賀久	名古屋大学農学部
	代田 欣二	麻布大学獣医学部・生物科学総合研究所
	川嶋 潤	麻布大学獣医学部
	小川 祐布子	麻布大学獣医学部
	大隈 瑞穂	麻布大学獣医学部
	立河 紗紀	麻布大学獣医学部
	寺西 瑞希	麻布大学獣医学部
	森 雅史	麻布大学獣医学部
	永岡 謙太郎	東京農工大学農学部 助教授
	臼田 賢人	東京農工大学農学部
	張 浩林	東京農工大学農学部
	堀井 康行	明治大学農学部農学科動物環境学研究室
	溝口 康	明治大学学部農学科動物遺伝資源学研究室
	中村 孝博	帝京平成大学薬学部薬学科
	小峰 千亜希	明治大学農学部農学科動物環境学研究室
	志賀 健臣	明治大学農学部農学科動物遺伝資源学研究室

研究要旨

本研究は申請をした 3 年の間に、現行の生殖発生毒性試験では検出できない化学物質の遅

発影響について、その標的として注目される前方に性周期等のサージ制御中枢、後方に卵胞発育等のパルス制御部位が存在する視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的变化を明らかにすることにより、遅発影響の機序を解明するとともに、また化学物質リスク評価に密接な遅発影響の閾値を明らかにする。共通被験物質 17α -ethynylestradiol (EE) $20\ \mu\text{g/kg}$ の新生児期単回皮下投与を遅発影響誘発の共通実験項目とし、平成 25 年度は以下の成

1. キスペプチン部位特異的検索

1) 早期性周期異常は、遅発影響の最も鋭敏な指標であるが、この性周期制御部位である視床下部と関連項目について検討した。その結果、遅発影響量の EE 新生児期単回曝露ラットでは、性周期異常に先立つ正常回帰状態においてすでに、LH サージの用量依存性の減弱が発現していた。それらの動物では LH サージ前からサージまで視床下部前方の Kiss1 遺伝子の発現も低下しており、middle age ラットと同様の結果であった。視床下部後方では Kiss1 遺伝子の発現に変化は認められなかった。これらの結果は、EE 新生児期曝露により LH サージを制御する視床下部前方の Kiss1 ニューロンが、性周期異常に先立ち変化して LH サージ低下を誘発させることが早期性周期異常の引き金であることを示している。 [高橋・渡辺・市村・永岡・臼田・井上・張]。

2) 遅発影響における視床下部と卵巣の優位性を確認するために、雄化および遅発影響誘発量のエストロゲン作用物質を新生児ラットに曝露し卵巣交換したところ、性周期異常は中枢が制御しており 遅発影響発現には雄化と同様、視床下部制御が必須であった[吉田・森川]。1,2)の結果は、性周期制御部位すなわち視床下部前方のキスペプチンが遅発影響の重要な標的であることを示唆する重要な所見である。 また卵巣への遅発影響の可能性も示唆されたので次年度さらに検討を追加する必要がある。

3) 遅発影響量 EE 新生時期単回曝露マウスにおいて内側視束前野 (MPOA) のカルベジン (CB) 含有細胞の性差が不明瞭化は、大脳における関連の神経核そのものが変化したのではなく、曝露により CB の発現量変化の反映であることが明らかになった [横須賀]。

4) 遅発影響量 EE 新生時期曝露雌ラットを成熟後に神経行動学的変化について検討した。その結果、性行動では用量依存的に高濃度で強く抑制される一方、受動回避学習行動試験においては低濃度で学習成績が低下することを明らかとした。また、大脳皮質と海馬におけるエストロゲン受容体 α 発現量が EE 曝露により低下する結果が得られたことから、遅発影響は行動へも影響を及ぼす可能性が示唆された[川口]。

2. 遅発影響の閾値

遅発影響量 EE 新生児期 5 日間経口曝露ラットにおいて、最高用量の $0.08\ \mu\text{g/kg}$ で不安定な性周期を示したことから、閾値はこの近傍に存在するものと推測された[代田]。また、新生時曝露時期の予備試験より 遅発影響発現の閾値は生後 10 日まで持続すると考えられた [吉田・市村]。これらの結果は、投与量、投与時期ともに遅発影響発現における閾値の存在を示唆している。投与時期については、遅発影響の質的な変化について次年度確認する。

A. 研究目的

A. 研究目的

化学物質臨界期曝による遅発影響は成熟後に至って生殖機能障害が顕在化し、その機序も不明なため化学物質リクス評価上の重大な懸念である。とくに本研究課題の分担研究者を中心とした過去3年間での研究において、これまでの研究で遅発影響の用量依存性、遅発影響指標(性周期早期異常や病理検査)等を示し、これらの遅発影響が現行の生殖発生試験観察期間では検出できないことが確認されたことから(Shirota et al., 2012; Takahashi et al., 213; Yoshida et al., 2011)、行政的にも遅発影響に対する早急な対応が望まれる。

一方繁殖生物学分野の最近のトピックスとして、視床下部のキスペプチンニューロンの制御機能は部位特異的が挙げられる。本研究の分担研究者である高橋らの研究において、遅発影響誘発量のエストロゲン新生児期曝露によるキスペプチン低下の可能性が示唆されたが、遅発影響に関連する部位特定や遅発影響の明確な発現機序まで解明することはできなかった。

上述のように、遅発影響による部位特異性の明確化は、その機序解明と指標の科学的根拠に極めて重要であるが、化学物質のリスク評価の観点から、遅発影響の閾値の研究も大変重要である。過去3年間の研究により、遅発影響の発現に明確な用量相関性が認められたことから、投与量の閾値を算出できると予想された。また遅発影響発現させる投与経路として経口投与も皮下投与と同様鋭敏であったため、本研究では経口投与による投与量の閾値も求めることを目的とした。また、ヒトは様々

な発達期に化学物質が曝露される可能性があることから、遅発影響発現と投与時期にの閾値についても本研究において明らかにし、化学物質リクス評価に資することを目指して解析を進めた。

3年間の研究計画は以下のとおりである。
全体計画

本研究では遅発影響機序解明の中核として、視床下部キスペプチンの変化を軸に研究を進める。最近の知見では、キスペプチン機能は部位により異なり、 17β -estradiol (E2)のポジティブフィードバックによる性周期に関わるサージ中枢と、E2のネガティブフィードバック機構による卵胞発育に関わるパルス制御中枢を制御が存在する。、いずれもE2がキー・ホルモンとして働くことから、本研究の独創的な点として、遅発影響のメカニズムを、視床下部キスペプチンニューロン前方に位置するE2の **positive feedback** 機構によるLHサージ制御部位と、後方のE2の **negative feed back** 機構の **sex steroid** 制御や卵胞形成等に関わるパルス制御部位に分けて解析を進める点である。前方の主担当は、高橋、渡辺、市村、臼田、井上らであり、後方は代田らが中心となった検索を進めている

相互的な研究体制は本研究の独創的な部分であるが、共通する内分泌機構の解析は、渡辺、長岡、臼田、張らが中心となり実施した。また視床下部・下垂体・性腺軸へと波及的する関連の神経核の解析は横須賀らが、行動学的解析は川口らが中心となった行った。

本研究のもう一つの目的である閾値研究については、投与経路と投与量、閾値につ

いては代田らが、投与時期と遅発影響については吉田、高橋、市村が中心となって研究を進めている。

H25年度は、

- 1 視床下部前方に関連する実験として、新生児期にEEを曝露したYoung adult雌ラットの視床下部前方のキスペプチンおよび関連遺伝子、LH サージ・下垂体・性腺への影響を検索およびそれらのmiddle agedラットと比較を行った。また新生時期エストロゲン様物質であるオクチルフェノール(OP)曝露ラットの卵巣を交換し、遅発影響の制御部位が中枢か卵巣かについて検討した。
2. パルス制御部位に関連する実験として、遅発影響と中枢神経における関連神経核・生殖行動への影響を1と同様に解析した。
3. 遅発影響の閾値に関する実験として、経口投与による投与量の遅発影響発現の閾値を求めた。また、遅発影響発現と投与時期にの閾値に関する検討を開始した。また平成25年度の実験については、17 α -ethynylestradiol (EE) 20 μ g/kgの新生児期単回皮下投与を遅発影響誘発の共通実験項目として実験を行い、視床下部のkiss1遺伝子も共通項目として組み込んで実験を行った。

B. 研究方法

1 視床下部前方に関連する実験

視床下部 LH サージ制御部位のキスペプチンの変化と生殖機能遅発影響

生後0日齢の雌性Donryuラットにsesami oil(対照群), EE (0.02, 0.2, 20 μ g/kg), エストロゲン受容体 α agonist PPT (1000 μ g/kg), エストロゲン受容体 β agonist DPN (1000 μ g/kg)を1回皮下投与し、正常性周期を示す10週齢で卵巣摘出後LHサージの誘起を行った。

血清LH濃度および視床下部前部あるいは後部(AVPVあるいはARC相当部位)におけるkiss1 mRNAの発現を経時的に解析した。加齢性変化と比較するため、20週齢の雌ラット(middle-age群)についても同様の検索を実施した。

出生後24時間以内の雌ラットに、EE 20 μ g/kg、200 μ g/kgを単回皮下投与した。性成熟後からサンプル採取までの間、膣スミアを観察することにより発情周期を記録した。90日齢において、発情前期(午前および午後)、発情期、休止期の各発情周期ステージでサンプルを採取し、各ステージにおける血中生殖関連ホルモン濃度の測定、脳における視床下部前方と後方のKiss 1および生殖関連遺伝子の発現解析を行った。

卵巣交換による遅発影響制御部位の特定
雌Donryuラットにエストロゲン様物質であるtert-Octylphenol(OP)を、遅発影響誘発量100mg/kg体重のOPを生後1~5日齢まで隔日に計3回(OP-PND 5)、オス化誘発量100mg/kg体重のOPを生後1~15日齢まで隔日に計8回(OP-PND 15)それぞれ皮下投与した。生後28日齢に対照群、OP-PND 5群、OP-PND15群の各群間で卵巣交換を行った。

中枢神経における関連神経核・生殖行動への影響

生後24時間以内の雌雄マウス

(C57BL/6J)に20 μ g/kg(中濃度)および2,000 μ g/kg(高濃度)のEE、対象群としてEEの溶媒として使用したゴマ油を投与し、一般飼育環境下(室温22°Cから25°C、湿度40%から60%)で飼育管理した。性成熟に達するまで、雌雄の体重の変化、雌については膣開口時期も観察した。生後8週齢以上に達した個体は、超音波の記録解析装置によってUSV発声の記録解析を行った。行動学的解析を終了した個体(生後75-90日)

は、(1) 免疫組織化学染色による解析を行うために経心臓法にて灌流固定を施して固定脳標本とした。内側視束前野 (POA) を含む脳切片標本 (厚さ 40 μ m の連続した冠状断切片) に対して Anti-Calbindon D-28k(CB)、GABA-B 受容体への特異的的一次抗体を用いた免疫組織化学染色を施して POA における CB 陽性細胞および GABA-B 受容体タンパク質の分布パターンを評価した。また、(2) RT-PCR による CB および GABA-B 受容体の視床下部における発現量を定量して比較するために、成熟マウスを断頭によって安楽死させて、PCR 解析用脳標本の採取を行った。

2. パルス制御部位に関連する実験として

上述の 1 視床下部前方に関連する実験視床下部 LH サージ制御部位のキスペプチンの変化と生殖機能遅発影響で使用したラットの視床下部後方の Kiss1 遺伝子について同様に解析した。また新生児期 EE を経口投与したラットの卵巣におけるゴナドトロピンおよびステロイド系の遺伝子解析を実施した。

EE を Wistar Imamichi ラット生後 24 時間以内に曝露し、各種神経行動学的解析を行った。海馬におけるエストロゲン受容体 (ER) α 発現について検討した。

3. 遅発影響の閾値に関する実験として

新生児期 EE5 日間経口曝露雌ラットにおける遅発影響出現の閾値およびエストロゲン活性

先行研究において、ラットの脳の性分化における臨界期とされている 1 日齢から 5 日間、EE を 0.4~2 μ g/kg 体重/日の用量で雌に反復経口投与すると、性周期の異常、排

卵周期の停止や乳腺の過形成などの遅発影響が認められ、性周期回帰停止までの期間は EE の用量低下に伴い延長することを示した。本研究では初年度としてまず、EE を 0.0032~0.08 μ g/kg 体重/日の用量で 1 日齢から 5 日間雌ラットに経口投与して新生児期投与による遅発影響出現における EE の閾値を推定した。また、EE を幼若雌ラットに 3 日間経口投与した子宮肥大試験を実施した。

遅発影響の発現時期の閾値に関する予備検討

Donryu ラットに遅発生殖器量誘発量である EE20 μ g/kg を生後 5 日齢、10 日齢あるいは 14 日齢に単回皮下投与し 22 週齢まで性周期を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物の使用は、動物の愛護及び管理に関する法律(昭和 48 年法律第 105 号、平成 17 年法律第 68 号一部改正)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年環境省告示第 88 号)厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年 6 月 1 日厚生労働省通知)、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成 19 年 6 月 1 日日本学術会議)、遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律(平成 15 年法律第 97 号)、特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律(平成 16 年法律第 78 号)及び感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(平成 10 年法律第 114 号)等の主旨に則り、作成された国立医薬品食品衛生研究所 動物実験の適正な実施に関する規定および分担研究者が各々所属する機関に設定された動物委員会

の規定等に基づき実施されたものであり、関連法令などを遵守して行われた。

C. 研究結果

1 視床下部前方に関連する実験

視床下部 LH サージ制御部位のキスペプチンの変化と生殖機能遅発影響(図 1~5)

EE 0.02 µg/kg 群を除いて、LH サージピークが低下する傾向がみられ、対照群がピークに達した 16:00 では、EE 20 µg/kg 群および middle-age 群において有意な低値が認められた。視床下部前部では、EE 20 µg/kg 群および middle-age 群で kiss1 mRNA の発現低下がみられたが、後部では群間差は認められなかった(図 1~3)。

90 日齢まで、対照群では全ての個体で正常発情周期を示したが、EE 投与群では 32 例中 2 個体(EE 20 µg/kg 投与群で 1 個体、EE 200 µg/kg 投与群で 1 個体)で異常発情周期を示す個体がみられた。対照群、EE 投与群ともに発情周期午後における黄体形成ホルモン (LH) のサージが観察されたが、EE 投与群では対照群に比べて EE 投与量に応じたサージピーク値の低下がみられた。90 日齢の脳については、LH サージに関与するとされる前腹側脳室周囲核および視索前野 (AVPV/POA) のキスペプチンの mRNA 発現量が EE 投与群で投与量に応じて低下していた。性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンおよび下垂体での LH mRNA 発現は対照群と EE 投与群で違いはみられなかった(図 4,5)。

卵巣交換による遅発影響制御部位の特定

対照群に遅発影響量曝露卵巣を埋植した個体は正常性周期を示し、遅発影響量群に

対照群の卵巣を埋植した場合は早期性周期異常が、オス化誘発量の個体に対照群卵巣を埋植した葉愛は速やかに持続発情が観察された。しかし、対照群にオス化誘発量の卵巣を埋植した群では、正常性周期へ回復しない個体が増加した。また遅発影響量曝露群では正常性周期下では繁殖能への影響認められなかった(図 6,7)。

中枢神経における関連神経核・生殖行動への影響(図 8)

生後 24 時間以内マウスへの EE 単回曝露は発育途上においても次のような影響を及ぼすことが明らかとなった。1) 対照群と比べて雌マウスの膣開口時期を早めた。それは投与濃度が高いほど早期になった。2) 生後 2 週間から 3 週間の間でのみ、EE 投与において一時的な体重増加の停滞時期があることが明らかとなった。しかし、この体重増加の停滞は離乳期前後には解消され、成熟期における EE 投与の影響は認められなかった。すなわち、生後 24 時間以内マウスへの EE 単回曝露が及ぼす体重変化への影響は授乳期における一過性の現象であることが示された。3) 発情雌認知に対する USV 発声は、雄では対照群では 90% 以上の確立で雌への USV 発声が認められるのに対し、EE 高濃度 (2,000µg) 群および中濃度群 (20µg) では USV 発声が認められない個体が多数認められた。一方の雌においては、対照群および EE 中濃度群では 10% 以下の確率でしか USV 発声が認められないのに対し、EE 高濃度群では 50% の確率で USV 発声が認められた。4) POA における CB 陽性細胞の分布パターンを詳細に観察したところ、EE 投与により認められる

雌の CB 陽性細胞数の増加は POA における CB 陽性細胞数の増加を反映したものであり、脳の構造的（組織的）な雌雄差の発現を誘導した結果では無いことがほぼ明らかとなった。5) 免疫組織化学染色および RT-PCR による GABA-B 受容体タンパク質および遺伝子の発現数への影響については、本報告書作成までに有意な解析を終えることが出来なかった。

2. パルス制御部位に関連する実験として

上述の 1 視床下部前方に関連する実験視床下部 LH サージ制御部位のキスペプチンの変化と生殖機能遅発影響の動物を用いて視床下部後方の Kiss1 遺伝子を解析したが、EE 投与による影響は認められなかった(図 9~11)。

新生児期 EE を経口投与したラットの卵巢の遺伝子解析では、性成熟前に LH 受容体や StAR の低下が認められた(図 12)。

受動回避学習試験では、エストロゲン存在下でのみ低濃度である 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露により学習成績が低下する一方、高濃度である 2 mg/kg EE 曝露では影響を及ぼさないことが示された。また、海馬ではエストロゲン存在下でのみ EE 曝露によるエストロゲン受容体(ER) α 発現が低下する一方、大脳皮質ではエストロゲン非存在下でのみ EE 曝露による ER 発現が低下した(図 13)。

3. 遅発影響の閾値に関する実験として

新生児期 EE5 日間経口曝露雌ラットにおける遅発影響出現の閾値およびエストロゲン活性(図 15)

新生児期 EE5 日間経口曝露雌ラットで遅発影響は、いずれの用量も性周期に明瞭な影響は及ぼさなかったが、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/

日投与群では 27~28 週齢の卵巢に嚢胞状卵胞を認める動物の割合が増加した。

一方、EE を幼若雌ラットに 3 日間経口投与した子宮肥大試験では、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日でも子宮重量の増加は認められなかった。

遅発影響の発現時期の閾値に関する予備検討(図 16)

22 週齢まで性周期を確認したところ、投与時期が PND 5 と PND 10 では、ほぼ同時期に早期異常性周期が認められたが、投与時期 PND 14 群における性周期は、対照群とほぼ同様の推移を示した。

D. 考察

1 視床下部前方に関連する実験

視床下部 LH サージ制御部位のキスペプチンの変化と生殖機能遅発影響

EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では、正常に性周期を回帰している個体においても、加齢ラットと類似して視床下部における排卵制御機能が減弱している可能性が見出された。視床下部の変化は性周期異常の発現に先行して生じており、排卵制御に関わる AVPV のキスペプチンニューロンが新生児期 EE 曝露の標的の一つであることが示唆された。

EE の新生児曝露により、発情周期の乱れといった遅発性影響がみられる以前より、LH サージの低下および LH サージの誘起に関連するキスペプチンの遺伝子発現量の低下が確認された。このことから、曝露後に脳内に移行した EE がキスペプチンの発現に直接関与する事で、遅発性影響に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

卵巢交換による遅発影響制御部位の特定

遅発影響および典型的オス化投与量ともに性周期の異常は、明らかに卵巢ではなく、移植された側に依存していて惹起されてい

た。すなわち視床下部の制御機構が遅発影響およびオス化惹起に優位であることが明らかとなった。

中枢神経における関連神経核・生殖行動への影響

本年度におけるマウス新生仔期（脳の性分化の臨界期）における高濃度 EE の単回暴露によるリスクは次のような評価となった。

(1)雌の膈開口時期を早める。(2)雌雄に関係なく授乳期における一時的な発育遅延を誘導する。晩発性のリスク評価として、(3)雄の USV 発声を抑制する一方、雌の USV 発声を促進している。(4)POA における CB 陽性細胞の雌雄差への影響は、脳の形態学的な変化を誘導した結果ではなく、成熟脳における CB を発現する細胞の増減を晩発性に変えた結果であることがほぼ判明した。(5)キスペプチンの動態に関与する GABA-B への影響についての評価は 26 年度に持ち越しである。

EE の新生仔期暴露は、全体的には一時的な発育遅延を及ぼしながらも、生殖器に関してはむしろ発育促進に作用していることが示唆される。このことが、脳の機能的な雌雄差に影響を及ぼし、成熟後の雌雄コミュニケーションにも影響を誘導していることが明らかとなった。脳の生殖機能の発達には発育期の GABA が関与している報告がある。新生仔期の EE が一時的発育遅延と GABA システムへの影響を介して、脳の性分化やキスペプチンシステムの性差にリスクを及ぼしている可能性を確認する必要がある。

3. 遅発影響の閾値に関する実験として

新生児期 EE5 日間経口曝露雌ラットにおける遅発影響出現の閾値およびエストロゲン活性

新生時期 EE 経口曝露胴部において、嚢胞状卵胞の形成増加が認められ、これは、先行研究でも遅発影響のひとつとして認められていることから、遅発影響に関する閾値は経口経路で $0.0016 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日付近に存在すると考えられた。一方、EE を幼若雌ラットに 3 日間経口投与した子宮肥大試験では、 $0.08 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日でも子宮重量の増加は認められず、臨界期曝露による遅発影響の閾値が子宮肥大試験における検出感度以下に存在することが明らかになった。さらに、先行研究において初回排卵に影響の認められた $0.4\sim 2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日の EE を投与して、視床下部/下垂体/性腺軸の中でも卵巣を中心にキスペプチンパルス制御部位と遅発影響との関係を解析した結果、卵胞の発育遅滞ならびに黄体形成ホルモン受容体(LHR)の発現低下が遺伝子およびタンパク質レベル、ならびにその下流遺伝子の発現レベル低下で確認された。

遅発影響の発現時期の閾値に関する予備検討

遅発影響の発生時期の閾値は生後 10 日齢と 14 日齢との間に存在する可能性が示唆された。遅発影響の閾値については、キスペプチンニューロンの解析を含め、詳細な検討を次年度に行う予定である。

E. 結論

1. キスペプチン部位特異的検索

1) 早期性周期異常は、遅発影響の最も鋭敏な指標であるが、この性周期制御部位である視床下部が遅発影響の標的なのか検討した。遅発影響量の EE 新生児期単回曝露ラットでは、性周期異常に先立ち性周期が正常回帰状態においてすでに、LH サージの用量依存性の減弱が発現していた。それら

の動物では LH サージ前からサージまで視床下部前方の **Kiss1** 遺伝子の発現が低下しており、**middle age** ラットと同様の結果であった。視床下部後方では **Kiss1** 遺伝子の発現に変化は認められなかった。これらの結果は、**EE** 新生児期曝露により LH サージを制御する視床下部前方の **Kiss1** ニューロンが、性周期異常に先立ち変化して LH サージ低下を誘発したことが、遅発影響の特徴とする早期性周期異常の引き金となることを強く示唆していた。

2) 遅発影響における視床下部と卵巣の優位性を確認するために、雄化および遅発影響誘発量のエストロゲン作用物質を新生児ラットに曝露し卵巣交換したところ、遅発影響発現には雄化と同様、視床下部制御が優位であった。1,2)の結果は、遅発影響の主な標的が視床下部前方ではある可能性を示している。

一方、視床下部後方におけるキスペプチンの変化は本年度は確定できなかったが、オス化誘発量では卵巣の影響も性周期異常に関与している可能性が認められた。新生児期 **EE** 経口投与ラットにおいても性成熟前より卵巣に観察されたゴナドトロピン・ステロイド関連遺伝子の異常についてさらに検討する必要がある。

3) 遅発影響量 **EE** 新生時期単回曝露マウスにおいて内側視床前野 (MPOA) のカルベニンジン (CB) 含有細胞の性差が不明瞭化は、大脳における関連の神経核そのものが変化したのではなく、曝露により **CB** の発現量変化の反映であることが明らかになった。

4) 遅発影響量 **EE** 新生時期曝露雌ラットを成熟後に神経行動学的変化について検討した。その結果、性行動では用量依存的に

高濃度で強く抑制される一方、受動回避学習行動試験においては低濃度で学習成績が低下することを明らかとした。また、大脳皮質と海馬におけるエストロゲン受容体 α 発現量が **EE** 曝露により低下する結果が得られたことから、遅発影響は行動へも影響を及ぼす可能性が示唆された。

2. 遅発影響の閾値

遅発影響量 **EE** 新生児期 5 日間経口曝露ラットにおいて、最高用量の $0.08 \mu\text{g}/\text{kg}$ で不安定な性周期を示したことから、閾値はこの近傍に存在するものと推測された[代田]。また、新生時曝露時期の予備試験より遅発影響発現の閾値は生後 10 日まで持続すると考えられた。これらの結果は、投与量、投与時期ともに遅発影響発現における閾値の存在を示唆している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Tamura K, Takahashi M, Yoshida M. Adaptive Parotid Gland Hypertrophy Induced by Dietary Treatment of GSE in Rats. *Toxicol Pathol.* 2013 In press.
- 2) Hayashi S, Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Matsuo S, Irie K, Watanabe G, Yoshida M. Effects of pyperonyl butoxide on the female reproductive tract in rats. *J Toxicol Sci.* 2013;38(6):891-902.
- 3) Yoshida M, Suzuki D, Matsumoto K, Shirota M, Inoue K, Takahashi M, Morita T, Ono A. Basic principles for setting acute reference dose, ARfD in Japan. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 2013;54(4):331-4. Japanese.
- 4) Inoue K, Morikawa T, Takahashi M, Yoshida M, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of grape skin

- extract in F344 rats. *J Toxicol Sci.* 2013;38(4):559-70.
- 5) Tamura K, Inoue K, Takahashi M, Matsuo S, Irie K, Kodama Y, Ozawa S, Nishikawa A, Yoshida M. Dose-response involvement of constitutive androstane receptor in mouse liver hypertrophy induced by triazole fungicides. *Toxicol Lett.* 2013 Jul 31;221(1):47-56. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.05.011.
 - 6) Yoshida M, Suzuki D, Matsumoto K, Shirota M, Inoue K, Takahashi M, Morita T, Ono A. Simulation of acute reference dose (ARfD) settings for pesticides in Japan. *J Toxicol Sci.* 2013;38(2):205-14.
 - 7) Sakamoto Y, Inoue K, Takahashi M, Taketa Y, Kodama Y, Nemoto K, Degawa M, Gamou T, Ozawa S, Nishikawa A, Yoshida M. Different pathways of constitutive androstane receptor-mediated liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis in mice treated with piperonyl butoxide or decabromodiphenyl ether. *Toxicol Pathol.* 2013;41(8):1078-92. doi: 10.1177/0192623313482055.
 - 8) **Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M.: Delayed effects of neonatal exposure to 17alpha- ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol.*, 40, 16-23, 2013.**
 - 9) **Matsuo S, Takahashi M, Inoue K, Tamura K, Irie K, Kodama Y, Nishikawa A, Yoshida M. Thickened area of external granular layer and Ki-67 positive focus are early events of medulloblastoma in Ptch1^{+/-} mice. *Exp Toxicol Pathol.*, 65, 863-73, 2013.**
 - 10) **Saori Matsuo, Miwa Takahashi, Kaoru Inoue, Kei Tamura, Kaoru Irie, Yukio Kodama, Akiyoshi Nishikawa, Midori Yoshida. Inhibitory Potential of Postnatal Treatment with Cyclopamine, a Hedgehog Signaling Inhibitor, on Medulloblastoma Development in Ptch1 Heterozygous mice. *Toxicol Pathol* 2014. In press.**
 - 11) Shirota M, Kawashima J, Nakamura T, Ogawa Y, Kamiie J, Shirota K. Vascular Hamartoma in the Uterus of a Female Sprague-Dawley Rat with an Episode of Vaginal Bleeding. *Toxicologic Pathology* 2013;41(7):1011-5. doi: 10.1177/0192623313476575.
 - 12) **Kaori Nozawa; Kentaro Nagaoka; Zhang Haolin; Kento Usuda; Sachiko Okazaki; Kazuyoshi Taya; Midori Yoshida; Gen Watanabe Neonatal exposure to 17α-ethynyl estradiol affects ovarian gene expression and disrupt reproductive cycles in female rats. *Reprod Toxicol.* 2014 In Press.**
 - 13) Li YS, Piao YG, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K, Li CM. Preventive effect of tert-butylhydroquinone on scrotal heat-induced damage in mouse testes. *Genet Mol Res.* 2013 Nov 11;12(4):5433-41. doi:10.4238/2013.November.11.5.
 - 14) Zhou J, Zhang H, Li J, Sheng X, Zong S, Luo Y, Nagaoka K, Weng Q, Watanabe G, Taya K. Molecular cloning and expression profile of a Halloween gene encoding Cyp307A1 from the seabuckthorn carpenterworm, *Holcocerus hippophaecolus*. *J Insect Sci.* 2013;13:56. doi: 10.1673/031.013.5601.
 - 15) Nagaoka K, Zhang H, Watanabe G, Taya K.

- Epithelial cell differentiation regulated by MicroRNA-200a in mammary glands. PLoS One. 2013 Jun 4;8(6):e65127. doi:
- 16) Li Y, Huang Y, Piao Y, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K, Li C. Protective effects of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 on whole body heat stress-induced oxidative damage in the mouse testis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013 Mar 21;11:23. doi: 10.1186/1477-7827-11-23.
 - 17) Li C, Li X, Suzuki AK, Zhang Y, Fujitani Y, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on pregnancy in rats. *J Reprod Dev.* 2013;59(2):145-50. Epub 2012 Dec 20.
 - 18) Zhang H, Nagaoka K, Imakawa K, Nambo Y, Watanabe G, Taya K, Weng Q. Expression of inhibin/activin subunits in the equine uteri during the early pregnancy. *Reprod Domest Anim.* 2013 Jun;48(3):423-8. doi: 10.1111/rda.12091. Epub 2012 Oct 9.
 - 19) Nakasato M, Kohsaka H, Mizutani T, Watanabe G, Taya K, Nagaoka K. Pregnancy-associated plasma protein (PAPP)-A expressed in the mammary gland controls epithelial cell proliferation and differentiation. *Endocrine.* 2013 Apr;43(2):387-93. doi: 10.1007/s12020-012-9766-0. Epub 2012 Aug 17.
 - 20) Fungfuang W, Nakada T, Nakao N, Terada M, Yokosuka M, Gizurarson S, Hau J, Moon C, Saito TR. Serum leptin concentrations, leptin mRNA expression, and food intake during the estrous cycle in rats. *Lab Anim Res.* 2013 Mar;29(1):1-6. doi: 10.5625/lar.2013.29.1.1.
 - 21) Fungfuang W, Nakao N, Nakada T, Yokosuka M, Saito TR. 2.Early onset of reproductive function in female rats treated with a high-fat diet. *J Vet Med Sci.* 2013 May 2;75(4):523-6.
2. 学会発表
 - 1) 吉田緑 **INHAND** フォローアップ:生殖器雌性生殖器に関する **INAHD** トピックスと問題点について (第30回日本毒性病理学会学術集会 (2014年1月30~31日 徳島))
 - 2) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, Pramod Dhakal, 井上薫, 前田潤, 吉田緑, 渡辺元: **EE** の臨界期曝露による遅発影響が **LH** サージおよび **kiss1 mRNA** 発現に及ぼす影響: 第30回日本毒性病理学会 (2014. 1)
 - 3) 川嶋 潤、中村 知裕、菅田 恵理世、鈴木 紗綾、小川 祐布子、吉田 緑: 新生ラットへのエチニルエストラジオール曝露が幼若期の卵巣における卵胞発育関連遺伝子の発現に及ぼす影響 第40回日本毒性学会学術年会 (2013年6月)
 - 4) 代田 眞理子: ラット周生期エストロゲン活性物質曝露による遅発影響-毒性学的視点での解析 第106回日本繁殖生物学会大会シンポジウム (2013年9月)
 - 5) 臼田賢人、野沢香織、永岡謙太郎、吉田 緑、田谷一善、渡辺 元 エチニルエストロゲンの雌ラットへの新生期曝露による血中ホルモンおよび生殖関連遺伝子発現の変化 第28回日本下垂体研究会(2013年8月 岩手)
 - 6) 横須賀誠 シンポジウム「生殖・発生・行動と化学物質」、新生仔マウスへの化学物質曝露が及ぼす性分化と生後神経新生への影響。第106回日本繁殖生物学会大会 (府中、東京)
 - 7) Kamishima, M., Uemura, H., Horii, Y., Watanabe, G., Taya, K., Harigaya, T., Takigami, H., Suzuki, G., Kondo, Y., Kawaguchi, M. **Effects of antiandrogen on sexual behavior, organ weight and hormone levels of male rats.** The

- Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo (2013年6月14日～18日、San Francisco, U.S.A.)
- 8) Shiga, T., Kawaguchi, M., Harigaya, T., Mizoguchi, Y. **Ethinyl estradiol exposure within 24 hours of birth affects Estrogen receptor α expression levels in adult female rats.** The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo (2013年6月14日～18日、San Francisco, U.S.A.)
- 9) Komine, C., Kamishima, M., Kobayashi, Y., Senbon, T., Uemura, H., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M. **Effects of neonatal ethinyl estradiol exposure to female rats on feeding, learning and sexual behavior.** 第36回日本神経科学大会 (2013年6月22日、京都)
- 10) 川口真以子、小峰千亜希、神島愛未、近藤保彦 **Effects of neonatal ethinyl estradiol exposure to female rats on sexual behavior.** 第106回日本繁殖生物学会大会シンポジウム (2013年9月12日～14日、東京)
- 11) Komine, C., Kamishima, M., Kobayashi, Y., Senbon, T., Uemura, H., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M. **Effects of estrogenic compounds exposure within 24 h after birth on feeding, learning and sexual behavior in female rat.** 4th International NeuroMalaysia Symposium (2013年9月28日、Malaysia)
- 12) Kamishima, M., Uemura, H., Horii, Y., Watanabe, G., Taya, K., Takigami, H., Suzuki, G., Kondo, Y., Kawaguchi, M. **Antiandrogen during juvenile induce hypoplasia of penis and suppression of sexual behavior of male rats.** 4th International NeuroMalaysia Symposium (2013年9月28日、Malaysia)
- 13) Shiga, T., (Nakamura, T. J., Goto, Y., Mizoguchi, Y., Komine, C., Kamishima, M., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M.) **Neonatal exposure to ethinyl estradiol influences the expression levels of estrogen receptor α in the adult brain of female rats.** Neuroscience 2013 (2013年11月8日～13日、San Diego, U.S.A.)
- 14) Komine, C., Kamishima, M., Odashima, Y., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M.(Kawaguchi, M.) **Effects of estrogenic compounds exposure within 24 h after birth on partner preference and sexual behavior in female rats.** Neuroscience 2013 (2013年11月8日～13日、San Diego, U.S.A.)
- 15) Shiga, T., Nakamura, T. J., Chiaki, K., Kamishima, M., Goto, Y., Yoshida, M., Kondo, Y., Mizoguchi, Y., Kawaguchi, M. **Exposure to ethinyl estradiol within 24 hours of birth decreases the expression levels of ER α in adult female rats.** 第16回日本内分泌攪乱化学物質学会 (2013年12月12日～13日、東京)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

1 視床下部前方に関連する実験

視床下部 LH サージ制御部位のキスペプチンの変化と生殖機能遅発影響

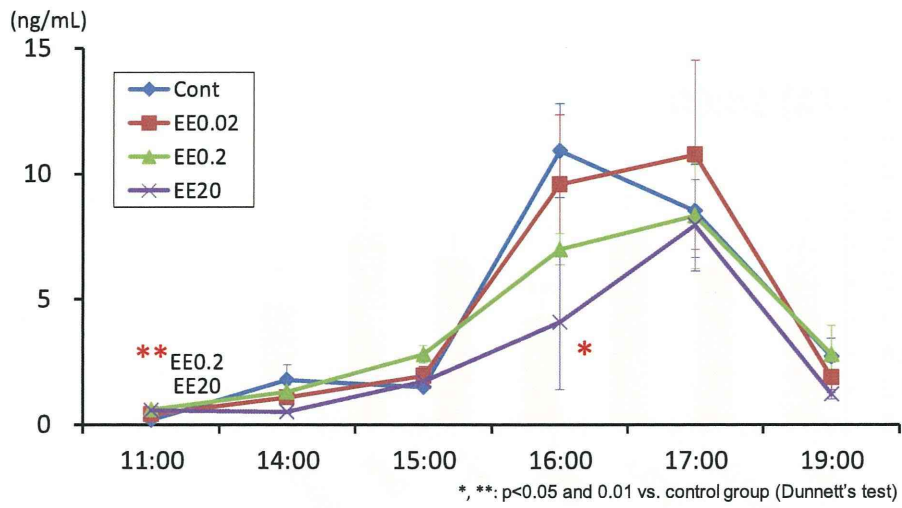


図1. EE群の血清LH濃度の推移

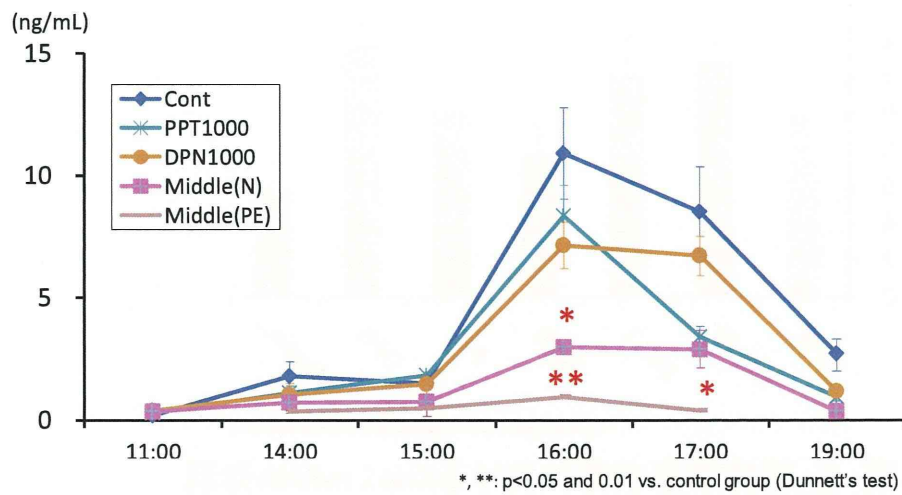
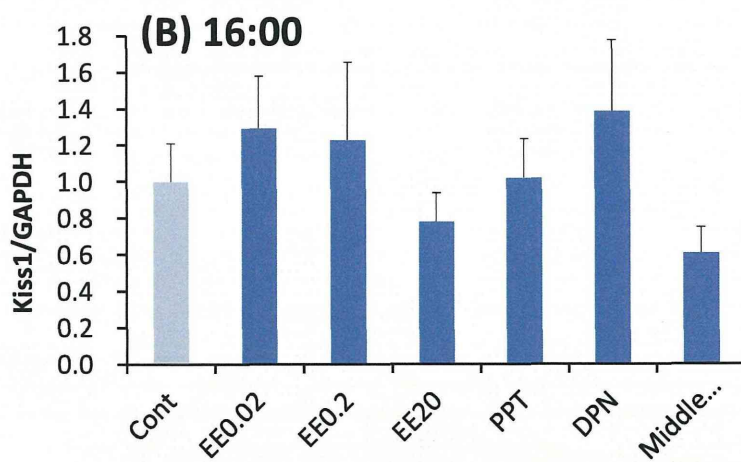
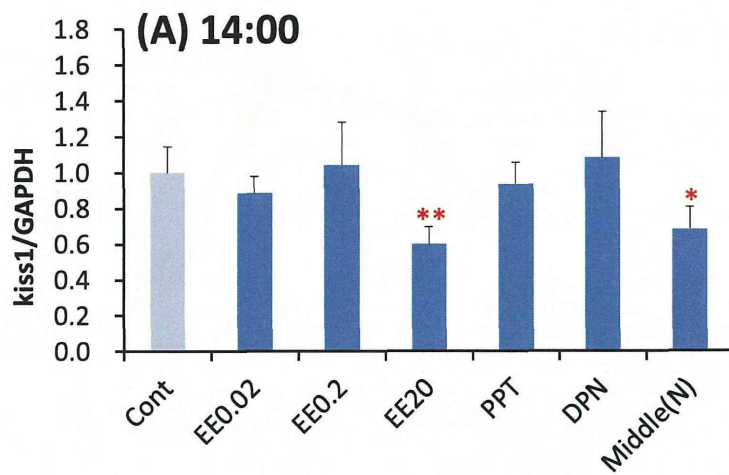


図2. PPT, DPNおよび加齢ラット群の血清LH濃度の推移



*, **, p<0.05 and 0.01 vs. control group (Dunnett's test)

図 3. 視床下部前部におけるKiss1 mRNA発現 (A)14:00, (B) 16:00

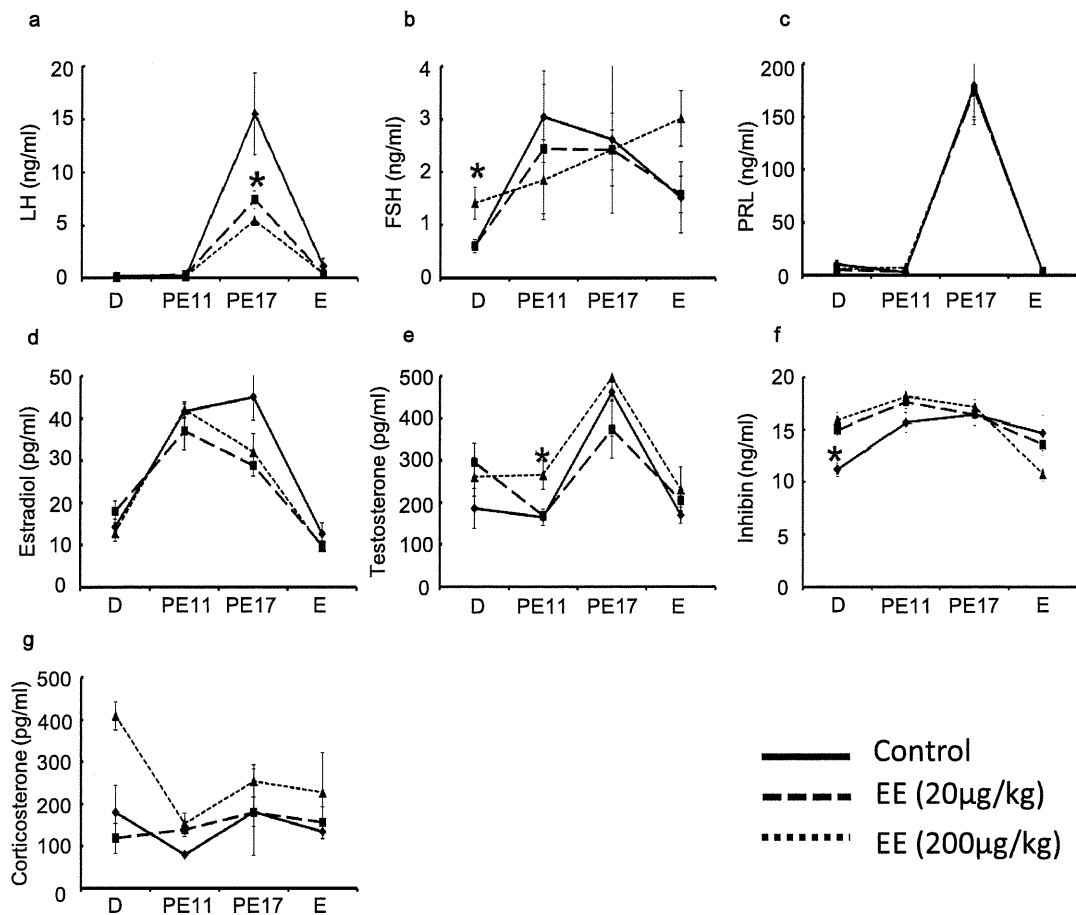


Figure .4 Changes in serum level of LH (a), FSH (b), proractin (c), estradiol -17β (d), testosterone (e), inhibin (f) and corticosterone (g) in neonatal EE treated rats. Bloods were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 µg/kg and 200 µg/kg). Hormone level was measured by RIA. Each point represents mean ± SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control (p<0.05).

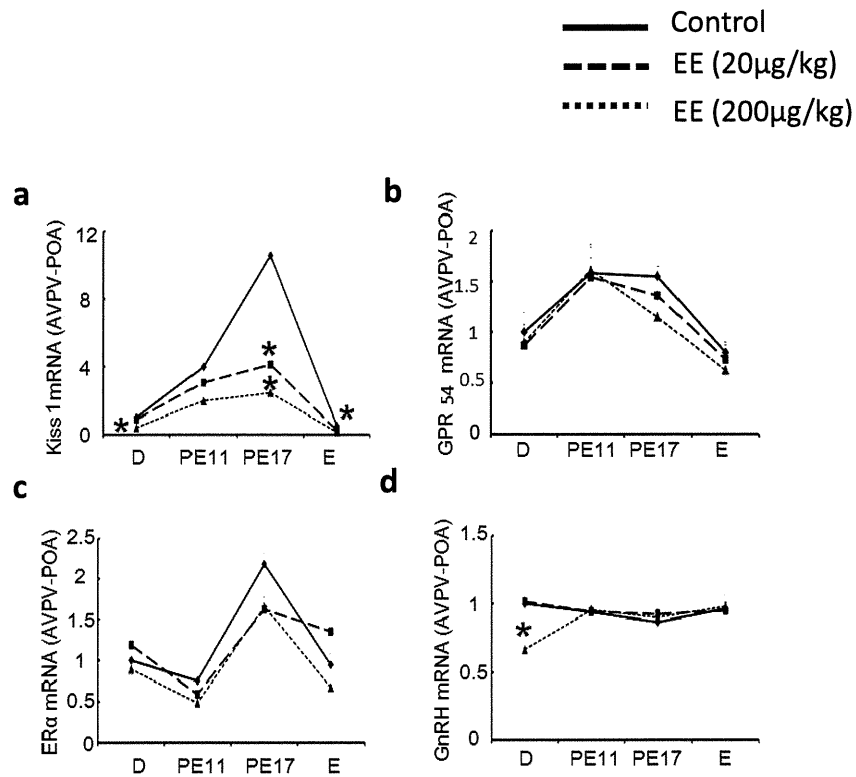


Figure.5 Changes in *kiss1* (a), *GPR54* (b), *ERα* (c) and *GnRH* (d) mRNA expression in AVPV/POA. Samples were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 μg/kg and 200 μg/kg). mRNA expression level was analyzed by real-time PCR. Each point represents mean ± SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control (p<0.05).